

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication :  
(A n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction).

2 422 956

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

**N° 78 10975**

(54) Procédé de détection et de caractérisation d'un acide nucléique ou d'une séquence de celui-ci, et réactif enzymatique pour la mise en œuvre de ce procédé.

(51) Classification internationale (Int. Cl.<sup>7</sup>). G 01 N 33/16.

(22) Date de dépôt ..... 13 avril 1978, à 16 h 1 mn.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du public de la demande ..... B.O.P.I. — «Listes» n. 45 du 9-11-1979.

(71) Déposant : INSTITUT PASTEUR et Etablissement public dit : AGENCE NATIONALE DE VALORISATION DE LA RECHERCHE (ANVAR), résidant en France.

(72) Invention de : Philippe Kourilsky, Stratis Avrameas, Brigitte Cami et Jean-Luc Guesdon.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Plasseraud.

L'invention est relative à un procédé de détection de la présence et, éventuellement, de caractérisation d'un acide nucléique ou d'une séquence de celui-ci au sein d'un échantillon susceptible de le contenir. Elle concerne aussi des réactifs nécessaires à la mise en oeuvre de ce procédé. Elle est enfin relative aussi à l'application d'un tel procédé, entre autres applications possibles, au diagnostic rapide in vitro de la présence dans un échantillon biologique, provenant notamment d'un hôte humain ou animal, de particules nucléiques déterminées, par exemple à caractère infectieux, ou encore de l'intégrité ou non de tel ou tel gène particulier appartenant au patrimoine génétique normal de l'hôte.

Il n'est pas nécessaire d'insister sur l'extraordinaire richesse en acides nucléiques variés que présente tout échantillon biologique, par exemple de sang, qu'il est possible de prélever sur tout être vivant. Il en est encore de même pour ce qui est des séquences différentes, par exemple des nombreux gènes, que peut contenir tout acide nucléique particulier au sein de cet échantillon ; d'où les difficultés immenses que le généticien peut rencontrer au niveau de la détection ou de la caractérisation de certains acides nucléiques dans un échantillon, difficultés qui sont encore décuplées dès lors qu'il s'agit de caractériser la présence de certains fragments, par exemple des gènes, contenus dans ces acides nucléiques.

La caractérisation d'un acide nucléique particulier ou de gènes particuliers - par exemple en vue de l'étude de l'organisation des séquences génétiques de l'ADN qui les contient - implique donc au préalable l'obtention à partir du milieu étudié, d'une fraction enrichie en cet acide nucléique. A cet effet, il a déjà été proposé des techniques d'enrichissement mettant à profit des réactions d'hybridation entre l'acide nucléique ou le gène recherché et une sonde, dans la mesure où celle-ci était disponible et où les hybrides formés pouvaient ensuite être séparés du milieu, par exemple par sédimentation différentielle au sein d'une solution soumise à une ultracentrifugation.

De telles sondes ont déjà été décrites : elles sont en général constituées par des acides ribonucléiques (ARN, ADN), tels que les ARN obtenus au cours de la transcription génétique des gènes de structure contenus dans les acides désoxynucléiques (ADN) des organismes cellulaires dont ils sont originaires, ces

ARN étant ensuite susceptibles d'être eux-mêmes "traduits" en les protéines susceptibles d'être codées par ces gènes de structure. On sait que ces ARN ont des séquences de nucléotides complémentaires de celles des ADN dont ils dérivent, cette complémentarité se manifestant par la capacité qu'ont ces ARN de former des hybrides mixtes avec les séquences correspondantes de ces ADN préalablement dénaturés, pour autant que ceux-ci étaient initialement bi-caténaires, par exemple après incubation dans un milieu de haute force ionique et à température élevée ou dans un milieu basique.

10 Il a été suggéré d'avoir recours, pour le repérage des hybrides formés, à un marquage radioactif soit des gènes eux-mêmes, soit des sondes d'ARN. Ces techniques sont cependant difficiles à mettre en oeuvre et, en outre, ne permettent pas toujours la localisation satisfaisante des gènes en question dans  
15 leurs ADN.

C'est dans le but de permettre une localisation plus aisée des gènes étudiés dans les ADN qui les contiennent, et de promouvoir une méthode d'obtention de fractions enrichies en segments d'ADN déterminés à partir de ces mêmes ADN que Manning et  
20 Coll. ont proposé une technique de détection physicochimique de ces gènes, consistant à modifier chimiquement la sonde d'ARN, par fixation sur celle-ci de groupes biotine, par l'intermédiaire de ponts formés par des groupes dérivés de cytochrome C et fixation sur l'ADN, après hybridation avec la sonde, de repères physiques  
25 visualisables au microscope électronique à balayage, formés par des sphères submicroscopiques ayant des diamètres de l'ordre de 60 nm, notamment à base de poly(méthacrylate), préalablement modifiées chimiquement et couplées de façon covalente à des molécules d'avidine (notamment dans les articles intitulés "A New Method  
30 of in situ Hybridization" (Une nouvelle méthode d'hybridation in situ), Chromosoma (Berl.) 53.107-117 (1975), Springer-Verlag 1975 et "A Method for Gene Enrichment Based on the Avidin-Biotin Interaction. Application to the Drosophila Ribosomal RNA Genes" (Une méthode pour l'enrichissement en gènes basée sur l'interaction avidine-biotine. Application aux gènes d'ARN ribosomiques de Drosophila), Biochemistry, Vol. 16, n° 7, 1364-1369, 1977).  
35

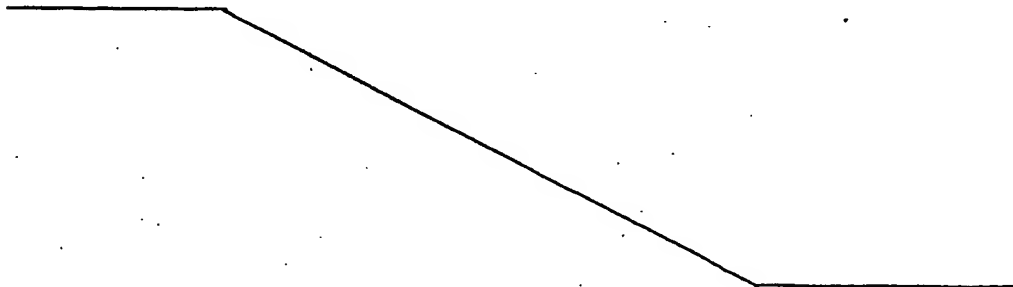
En effet, l'incubation des hybrides modifiés à la biotine en présence des sphères submicroscopiques modifiées à l'avidine permet de "marquer" et de rendre repérables les emplacements des  
40 gènes recherchés dans l'ADN qui les contient, vis-à-vis de la

structure globale également visible au microscope électronique de cet ADN, du fait des interactions non covalentes très puissantes qui sont alors produites entre les sites demeurés libres de la biotine et de l'avidine.

- 5            Cette méthode ne peut cependant guère être mise en oeuvre aux fins d'une détection rapide de la présence ou non de tels gènes ou de tels ADN au sein d'un échantillon biologique provenant d'un hôte humain ou animal, par exemple dans le but d'établir un diagnostic rapide soit de l'affection dont l'hôte peut éventuellement être atteint, soit de l'intégrité ou non d'un gène ou d'une séquence d'ADN par exemple, chez cet hôte.

- 10           L'invention découle de la transformation de la méthode de Manning et Coll., transformation qui conduit à des techniques de détection, voire de caractérisation, susceptibles d'être  
15 mises en oeuvre en l'absence d'équipements coûteux, par des personnes n'ayant qu'une expérience de laboratoire réduite.

- Le procédé de détection selon l'invention de la présence éventuelle ou de caractérisation d'une séquence ou fragment déterminé d'acide nucléique, notamment d'un gène, voire de l'acide  
20 nucléique entier au sein d'un échantillon d'acides nucléiques-complexe, par mise en contact de l'échantillon, le cas échéant après dénaturation préalable de l'acide nucléique étudié, avec une sonde comprenant un acide nucléique complémentaire, susceptible de s'hybrider avec la séquence d'acide nu-  
25 cléique ou l'acide nucléique recherché, est caractérisé en ce que la sonde utilisée est une sonde modifiée chimiquement par couplage ou en vue de son couplage avec une enzyme antérieurement ou postérieurement à la réaction d'hybridation, l'éventuelle présence de la séquence d'acide nucléique ou de l'acide nucléique cherché étant révélabl  
30 par l'action du produit d'hybridation ainsi transformé de la sonde et de la séquence ou de l'acide nucléique recherché, sur un substrat de l'enzyme.



Avantageusement, l'enzyme est choisie selon sa capacité à agir sur un substrat chromogène, ce qui permet de doser, par analyse optique ou analogue, le taux de transformation du substrat, taux qui est alors corrélable à la présence ou non de la séquence d'acide nucléique ou de l'acide nucléique recherché dans l'échantillon initial.

Dans un mode de mise en oeuvre préféré de l'invention, la sonde est modifiée par un groupe chimique susceptible de former un complexe stable avec l'enzyme ou une molécule elle-même liée de façon stable à l'enzyme. Avantageusement, le susdit groupe chimique et la susdite molécule sont respectivement constitués par la biotine et l'avidine ou vice versa, l'enzyme étant elle-même avantageusement constituée par la  $\beta$ -galactosidase.

Il va de soi que la modification chimique doit être telle qu'elle n'empêche pas l'hybridation ultérieure éventuelle de la sonde avec la séquence ou le fragment d'ADN recherché.

Il apparaîtra immédiatement au spécialiste que cette technique permet une détermination rapide de la présence ou non dans un échantillon biologique du gène ou fragment d'ADN correspondant à la sonde utilisée, et ce même en présence d'une quantité considérable d'autres acides nucléiques. Il en est particulièrement ainsi du fait de l'amplification au niveau de la détection qui est obtenue par l'action de l'enzyme fixée à l'hybride sur le substrat mis en sa présence. Il est même possible, après une purification suffisante de l'hybride, d'obtenir une indication quant à la concentration de l'échantillon biologique étudié en ADN recherché ou quant au taux de répartition du gène recherché dans un ADN purifié, par dosage de l'activité enzymatique constatée.

Partant d'un échantillon d'acide nucléique à étudier, on peut d'abord réaliser l'hybridation, puis la réaction de couplage entre la sonde chimiquement modifiée et hybridée, d'une part, de l'enzyme, d'autre part, procéder ensuite à la séparation ou à la dégradation de l'éventuel excès de sonde non hybridée et de l'excès d'enzyme qui n'a pas réagi avec la sonde, avant d'effectuer le susdit dosage.

En variante, la séparation ou la dégradation de l'éventuel excès de sonde non hybridée peut être réalisée avant la réaction de couplage entre la sonde chimiquement modifiée et hybridée, d'une part, et l'enzyme, d'autre part.

La sonde spécifique peut être constituée par tout ARN spécifique ou ADN soit à simple brin (mono-caténaire), soit dénaturé au préalable par des techniques en soi connues, s'il s'agit d'un ADN (ou d'un ARN) initialement à double brin.

5 Lorsque la modification chimique de la sonde est effectuée à l'aide de la biotine, on peut avoir recours à la technique décrite par Manning & Coll. dans les publications déjà mentionnées, par l'intermédiaire de cytochrome C, notamment à raison d'une molécule de biotine en moyenne pour une centaine  
10 de nucléotides.

Avantageusement, on a alors recours pour le marquage de l'hybride par l'enzyme, au produit résultant du couplage de l'avidine et de l'enzyme, notamment la  $\beta$ -galactosidase, par la méthode d'Avraméas ("Immunochemistry", 1969, 6, 43-52).

15 Il va de soi que l'on peut avoir recours à d'autres modifications chimiques de la sonde et, le cas échéant, de l'enzyme, en vue de réaliser leur couplage, de préférence après la réaction d'hybridation, et que l'on peut inverser les agents modificateurs de la sonde et de l'enzyme respectivement.

20 D'autres couples d'agents modificateurs de la sonde, d'une part, et de l'enzyme, d'autre part, peuvent encore être utilisés. A titre d'exemple, on citera les couples suivants, le premier de ces agents étant de préférence utilisé pour la modification chimique de la sonde et le second pour la modification chimique de  
25 l'enzyme. Par exemple, la sonde peut être modifiée, selon une méthode connue, par des ions métalliques (mercure par exemple) et la révélation est faite par l'intermédiaire d'une enzyme dotée de groupements sulfhydryles (-SH) ou couplée à un support comportant de tels groupements.

30 A titre d'exemple bien entendu non limitatif d'un protocole expérimental qui peut être mis en oeuvre dans le cas où l'échantillon à analyser est constitué par une prise de sang de quelques millilitres, on pourra procéder comme suit :

40 Les cellules sanguines sont d'abord lysées et l'ADN en est extrait par une technique conventionnelle.

Une faible quantité de l'ADN obtenu, par exemple comprise entre 1 et 100  $\mu$ g, est dénaturée par la soude 0,1 à 0,3 N, la solution étant ensuite neutralisée et ramenée à pH 7.

A la solution obtenue, on ajoute alors la sonde correspondant au fragment d'ADN ou à l'ADN recherché à raison d'environ 1 µg de sonde par 100 µg d'ADN dénaturé (la quantité de sonde à utiliser est fonction de la proportion d'ADN recherchée dans l'échantillon à analyser). La solution est ensuite complétée avec des sels destinés à conférer au milieu une force ionique élevée, au moins 0,3 M NaCl, en présence de formamide 50 % et d'un agent chélateur à faible concentration, de préférence dans un petit volume. L'hybridation peut ensuite être réalisée à la température ordinaire pendant 1 à 40 heures (en général la nuit). On peut aussi utiliser la technique déjà décrite par Manning. En variante, on peut avoir recours à toute autre technique d'hybridation, par exemple celle décrite par KOHNE et al dans "Biochemistry" (1977) (16, 5329-5341), à la température ordinaire au sein d'une émulsion de phénol.

De l'avidine couplée à une enzyme telle que la β-galactosidase est alors ajoutée au milieu dans des conditions permettant le couplage de la biotine de la sonde aux groupes libres de l'avidine du composé de couplage de l'avidine et de l'enzyme.

La sonde non hybridée est alors séparée de la sonde hybridée par les techniques conventionnelles, telles que précipitation au polyéthylène glycol, passage sur gel, par exemple celui du type dénommé SEPHAROSE, ultracentrifugation, etc.

En variante, on peut aussi réaliser la séparation de la sonde non hybridée avant le couplage de l'avidine portant l'enzyme avec les groupes biotine couplés à la sonde hybridée à l'ADN.

L'enzyme éventuellement fixée et corrélativement l'hybridation effective éventuelle de la sonde avec l'ADN étudié peuvent être révélées en mettant en contact avec le milieu un substrat de l'enzyme, notamment celui constitué par l'orthonitrophénol galactoside (ONPG).

Il va de soi que les conditions expérimentales une fois bien fixées, il est possible de déterminer un seuil d'activité mesurable, par exemple par une technique colorimétrique ou fluorographique, au-delà duquel il est possible de conclure à la présence dans l'échantillon traité de l'ADN ou du fragment d'ADN recherché.

La description qui suit d'un essai réalisé au laboratoire a pour simple but d'illustrer la façon dont le procédé selon

l'invention peut être mis en oeuvre, étant évidemment entendu que les variations au niveau des techniques, en fonction de la nature de l'échantillon biologique étudié et de celle de l'ADN ou du fragment d'ADN recherché sont à l'évidente portée de l'homme de l'art.

L'expérimentation a été réalisée sur le modèle consistant à détecter la présence d'un ADN de souris par hybridation de cet ADN avec un ARN ribosomique de souris utilisé à titre de sonde.

L'ADN de souris (100 µg par 100 µl de solution aqueuse) est dénaturé par une addition de soude (10 µl de NaOH 1 M). 10 minutes plus tard, la solution est ramenée à pH neutre par addition de 10 µl de phosphate acide de sodium  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1,5 M. 1 µg d'ARN ribosomique marqué avec de la biotine par l'intermédiaire de cytochrome C, préparé selon la technique de Manning & Coll., est ajouté à la solution d'ADN dénaturé. Le volume est ajusté à 160 µl avec de l'eau. On ajoute alors au milieu 40 µl d'une solution ayant une concentration en sels minéraux égale à vingt fois celle de la solution dite SSC (abréviation de l'expression anglaise "standard saline citrate") et 200 µl de formamide redistillé ou déionisé. Il est rappelé que la solution SSC est une solution aqueuse de chlorure de sodium 0,15 M, de citrate de sodium 0,015 M, à pH 7,0.

Le mélange est incubé jusqu'au lendemain à la température ordinaire, puis dialysé à 4° C contre une solution ayant une concentration double de la solution SSC, puis pendant 8 heures, contre 500 ml d'un tampon phosphate à pH 7,0 contenant du phosphate à une concentration de 0,1 M, du chlorure de sodium à une concentration de 1 M et de l'éthylène-diamine-tétrahydroxy (EDTA) à une concentration de 0,01 M. Cette dernière dialyse est ensuite répétée deux fois, chaque fois pendant 8 heures.

La solution ainsi obtenue est traitée avec de la ribonucléase pancréatique pendant 1 heure à température ordinaire, pour obtenir une concentration finale de 10 µg par ml de ribonucléase, ce traitement permettant la dégradation de l'ARN non hybridé.

On ajoute alors au milieu obtenu une solution du cytochrome C (1 mg par ml) et 1 microlitre d'une solution contenant 1 mg par ml d'avidine et 2 mg par ml de β-galactosidase, dont une molécule de β-galactosidase sur sept se trouve couplée à l'avidine. On mélange et on maintient ensuite la solution au

2422956

repos à 4° C pendant 4 heures. Le milieu est ensuite dilué jusqu'à 10 ml avec le tampon de dialyse au phosphate et on soumet la solution obtenue à une ultracentrifugation pendant 1 heure à 35.000 tours par minute (dans une centrifugeuse BECKMAN ROTOR SW 41). L'ADN et l'ARN hybridés se retrouvent dans le culot de centrifugation, ainsi que l'avidine  $\beta$ -galactosidase liée à cet ARN. Le surnageant contient l'ARN non hybridé dégradé par la ribonucléase et l'avidine  $\beta$ -galactosidase non liée.

On recueille le culot et on le resuspend dans 10 ml de tampon. On recentrifuge et on reprend une nouvelle fois le culot dans 0,5 ml de tampon (tube n° 1) et on dose alors l'activité de la  $\beta$ -galactosidase sur le substrat ONPG selon la technique décrite par Miller ("Experiments in bacterial genetics, 1972, Cold Spring Harbor Laboratory", Cold Spring Harbor, New York, USA), par mesure de la densité optique du milieu à 420 m $\mu$ , après incubation du milieu à 37° C pendant 30 minutes ou plus.

On prépare des témoins dans des conditions rigoureusement identiques à celles qui ont été décrites ci-dessus, sauf que dans un premier cas on omet l'addition initiale de l'ARN ribosomique (tube n° 2) et que dans l'autre cas on omet l'addition de l'ADN de souris (tube n° 3).

Les résultats des trois dosages effectués figurent dans le tableau ci-dessous :

Tube n°	contenu		Résultat du dosage (densité optique à 420 m $\mu$ après 30 minutes à 37° C)
	ADN	ARN	
1	+	+	0,45
2	+	-	0,14
3	-	+	0,15

Les signes + et - , respectivement dans les colonnes sous les entêtes ADN et ARN, signifient la présence ou l'absence soit de l'ADN, soit de l'ARN, dans le milieu initial.

Comme on peut le constater à l'examen de ce tableau, la densité optique mesurée dans le tube n° 1 (contenant l'hybride) est supérieure de façon très significative aux densités optiques mesurées dans les tubes témoins.

Le modèle expérimental qui vient d'être décrit illustre donc les conditions dans lesquelles peut être détecté l'éventuelle présence d'un ADN ou fragment d'ADN recherché, dans la mesure où l'on dispose d'une sonde complémentaire de cet ADN ou de ce fragment d'ARN, en ayant recours à une technique simple et n'exigeant ni matériel de laboratoire très compliqué ni technicien particulièrement expérimenté.

L'invention est applicable de façon particulièrement avantageuse à des opérations de diagnostic in vitro de la présence, par exemple dans un échantillon biologique (échantillon sanguin, prélèvements de selles, etc.) de virus divers, tels que ceux dénommés Herpès, Epstein Barr, virus Pox, cytomegalo, etc. De même, l'invention peut être appliquée au diagnostic par exemple d'anomalies chromosomiques spécifiques.

Elle est applicable également à la réalisation de diagnostics bactériens, en particulier dans le cas où des individus seraient porteurs de gènes pathogènes, tant exprimés que non exprimés (ou latents).

Il apparaîtra naturellement au spécialiste, dans le cas d'une recherche d'un ADN infectieux, que l'on peut rapidement conclure au caractère sain de l'échantillon biologique traité, eu égard à l'acide nucléique ou au fragment d'acide nucléique recherché, en l'absence d'induction constatée sur le substrat chromogène, ou au moins d'un dépassement de seuil d'activité, soit déterminé expérimentalement, soit par comparaison avec des témoins exempts du virus.

A l'inverse, l'absence d'action constatée à l'égard du substrat chromogène, notamment au-delà du seuil mentionné ci-dessus, pourra, dans l'autre type d'application, envisagé ci-dessus à titre d'exemple, traduire la présence d'une anomalie de l'anomalie chromosomique recherchée, en l'absence d'hybridation constatée, totale ou partielle, entre la sonde et l'ADN étudié.

On peut avantageusement mettre, par exemple à la disposition des laboratoires d'analyses médicales, des troussees ou "kits" contenant l'ensemble des réactifs essentiels à la mise en oeuvre du procédé selon l'invention. Ces troussees peuvent en particulier contenir un échantillonnage de sondes correspondant par exemple aux ADN des virus ou bactéries, de virus ou bactéries pathogènes classiquement recherchés, voire même des sondes rela-

tives à des gènes particuliers que devraient normalement contenir les échantillons biologiques, notamment sanguins, à tester.

A ce titre, l'invention concerne donc une trousse ou "kit" caractérisé en ce qu'il comporte :

- 5 - au moins une sonde spécifique formée d'un ARN ou d'un brin d'ADN unique, caractéristique d'une séquence d'acide nucléique ou d'un acide nucléique à rechercher, cette sonde étant modifiée chimiquement en vue de son couplage avec une enzyme,
- 10 - ladite enzyme, éventuellement modifiée de façon à pouvoir être couplée avec ladite sonde,
- un substrat, notamment chromogène, spécifique de l'enzyme,
- les réactifs nécessaires à la lyse du milieu cellulaire à étudier, notamment sanguin, et à l'extraction des acides nucléiques des cellules de ce milieu.

15 Comme on l'a déjà constaté dans ce qui précède, il est avantageux de constituer la sonde modifiée par une sonde à laquelle est liée de la biotine, l'enzyme modifiée étant alors constituée par l'enzyme elle-même, par exemple la  $\beta$ -galactosidase, couplée à de l'avidine.

20 L'invention concerne d'ailleurs également, à titre de produits industriels nouveaux, les produits de couplage d'une enzyme (dont l'action peut être révélée à l'égard d'un substrat, notamment chromogène) et d'une sonde (ARN ou ADN à simple brin), soit directement, soit par l'intermédiaire d'un agent de couplage.

25 Elle concerne également encore le produit de couplage de l'enzyme et d'au moins une molécule chimique, l'ensemble étant alors susceptible d'être couplé à son tour avec une sonde (ARN ou ADN), si besoin modifiée, elle-même susceptible de s'hybrider avec un ADN ou fragment d'ADN. A titre d'exemples de tels produits industriels nouveaux, on cite les produits de couplage d'une sonde

30 (ARN ou ADN) avec une enzyme, telle que la  $\beta$ -galactosidase, ou encore les produits de couplage de l'avidine ou de la biotine avec une telle enzyme.

Bien entendu, l'invention peut être mise en oeuvre dans

35 d'autres domaines d'application, notamment pour le marquage de certains fragments d'ADN dans les expériences génétiques bien connues visant à établir le génotype de l'ADN en question. En particulier, l'invention peut être appliquée à la détermination de l'incorporation ou non d'un fragment d'ADN particulier dans

40 des expériences de tri génétique comportant par exemple des opé-

5 rations de transformation de l'ADN d'une cellule infectée avec un  
ADN étranger contenant le fragment d'ADN en question ou au con-  
traire des opérations de transduction comportant l'incorporation  
d'un fragment d'ADN en question, normalement contenu dans l'ADN  
de la cellule, dans l'ADN du virus utilisé pour l'infection de  
la cellule, etc., dans la mesure où, bien entendu, on dispose d'une  
sonde constituée par le fragment d'ARN ou d'ADN complémentaire  
du fragment d'acide nucléique recherché.

Comme il va de soi et comme il résulte d'ailleurs déjà  
10 de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de  
ses modes d'application et de réalisation qui ont été plus spé-  
cialement envisagés ; elle en embrasse au contraire toutes les  
variantes, notamment celles où l'on a recours aux modifications  
de la sonde qui peuvent permettre le dosage enzymatique de  
15 l'hybride et les modifications concernant la formation et/ou la  
purification des hybrides, au marquage ou à la modification  
chimique de l'ADN étudié lui-même, dans des conditions qui ont  
été exposées plus haut, la sonde ARN ne faisant l'objet d'aucun  
marquage particulier ; une telle inversion des réactifs peut  
20 être envisagée, par exemple dans le cas d'un ADN comportant de  
nombreux exemplaires de gènes répétitifs, que l'on souhaite  
isoler de l'ADN entier, sous forme d'hybride avec la sonde,  
après fragmentation de l'ADN en question par des techniques  
classiques. Il va de soi que ces équivalents sont inclus dans le  
25 domaine de protection défini par les revendications.

A titre d'autre variante encore, on peut avoir recours  
à un procédé consistant à repérer l'hybride formé par l'ADN re-  
cherché et la sonde, au moyen d'un anticorps anti-hybride, couplé  
à une enzyme telle que la  $\beta$ -galactosidase.

REVENDECATIONS

1 - Procédé de détection de la présence éventuelle ou de caractérisation d'une séquence ou fragment déterminé d'acide nucléique, notamment d'un gène, voire de l'acide nucléique entier au sein d'un échantillon d'acides nucléiques complexe, par mise en contact de l'échantillon, le cas échéant après dénaturation préalable de l'acide nucléique étudié, avec une sonde comprenant un acide nucléique complémentaire, susceptible de s'hybrider avec la séquence d'acide nucléique ou l'acide nucléique recherché, caractérisé en ce que la sonde utilisée est une sonde modifiée chimiquement par couplage ou en vue de son couplage avec une enzyme, antérieurement ou postérieurement à la réaction d'hybridation, l'éventuelle présence de la séquence d'acide nucléique ou de l'acide nucléique cherché étant révélable par l'action du produit d'hybridation ainsi transformé de la sonde et de la séquence ou de l'acide nucléique recherché sur un substrat de l'enzyme.

2 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'enzyme est choisie selon sa capacité à agir sur un substrat chromogène, et en ce que l'on dose, par analyse optique ou analogue, le taux de transformation du substrat, taux qui est alors corrélable à la présence ou non de la séquence d'acide nucléique ou de l'acide nucléique recherché dans l'échantillon initial.

3 - Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que la sonde est modifiée par un groupe chimique susceptible de former un complexe stable avec l'enzyme ou une molécule elle-même liée de façon stable avec l'enzyme.

4 - Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le susdit groupe chimique et la susdite molécule sont respectivement constitués par la biotine et l'avidine ou vice-versa.

5 - Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'enzyme est constituée par la  $\beta$ -galactosidase.

6 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que l'on réalise d'abord l'hybridation, puis la réaction de couplage entre la sonde chimiquement modifiée et hybridée, d'une part, et l'enzyme, d'autre part, et

---

en ce que l'on procède ensuite à la séparation ou à la dégradation de l'éventuel excès de sonde non hybridée.

7 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que l'on réalise d'abord l'hybridation et en ce que l'on réalise la réaction de couplage entre la sonde chimiquement modifiée et hybridée, d'une part, et l'enzyme, d'autre part, après séparation ou dégradation de l'éventuel excès de sonde non hybridée.

8 - Trousse ou "kit", caractérisé en ce qu'il comporte :

- au moins une sonde spécifique formée d'un ARN ou d'un brin d'ADN unique, caractéristique d'une séquence d'acide nucléique ou d'un acide nucléique à rechercher, cette sonde étant modifiée chimiquement en vue de son couplage avec une enzyme,
- ladite enzyme, éventuellement modifiée de façon à pouvoir être couplée avec ladite sonde,
- un substrat, notamment chromogène, spécifique de l'enzyme,
- les réactifs nécessaires à la lyse du milieu cellulaire à étudier, notamment sanguin, et à l'extraction des acides nucléiques des cellules de ce milieu.

9 - Trousse selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle comporte :

- au moins une sonde ARN à laquelle est liée de la biotine,
- le produit de couplage de l'avidine et d'une enzyme, telle que la  $\beta$ -galactosidase.

10 - Produit de couplage d'une enzyme, notamment révélabile par son action à l'égard d'un substrat chromogène, et d'une sonde (ARN ou ADN), soit directement, soit par l'intermédiaire d'un agent de couplage.

11 - Produit de couplage d'une enzyme, notamment dont l'action peut être révélée à l'égard d'un substrat chromogène, et d'au moins une molécule chimique, l'ensemble étant alors couplable avec une sonde ARN ou ADN, si besoin modifiée à cet effet.

12 - Produit de couplage selon la revendication 11 d'une enzyme, telle que la  $\beta$ -galactosidase, et d'une substance telle que l'avidine ou la biotine.